

# 探討影響牡蠣受精及卵裂之環境因子

楊宗儒 陳靖昀 蕭如雅 房樹生  
臺南縣私立港明高級中學

## 摘要

本論文主旨在探討牡蠣的最佳受精率與分裂率的環境因子。結果發現牡蠣的馴養最佳鹽度為 35ppt，在此鹽度馴養的牡蠣卵子有較佳的完整性。當精卵濃度比為 5：1 時，有較高的受精率；當精卵濃度比為 1：1 時，有較高的卵裂率；當鹽度為 35ppt 時，有較高的受精率及卵裂率。當鈣離子濃度為 0.5mM 時，精卵有較高的受精率及卵裂率。當溫度為 27℃ 時，有較高的受精率及卵裂率。

## 一、前言：

在一次的社團活動中，我們進行牡蠣的受精實驗，觀察受精卵的卵裂過程，十分有趣。但有些組無法成功地觀察到受精卵的卵裂，有些組卻可以得到許多分裂中的受精卵，這些差異讓我們想進一步了解，在何種環境條件下可以得到最好的受精成功率及受精卵卵裂率？因此設計本研究以解答個問題。

## 二、研究設備器材：

- (一)生物材料：新鮮牡蠣（當天剝取）
- (二)顯微器材：光學顯微鏡、顯微照相機、載玻片、蓋玻片
- (三)化學材料：粗鹽調製不同鹽度的人工海水、1M 氯化鈣溶液
- (四)測量器材：微量吸管、量筒、溫度計、鹽度計、計數器
- (五)其他：燒杯、解剖刀、解剖針、打氣機、封口膜、蒸餾水、保麗龍、大水缸

## 三、研究方法：

方法(一)：馴養以保持卵子完整的最佳鹽度

- 1.將新鮮牡蠣分別放入 20ppt、25ppt、30ppt、35ppt、40ppt 之人工海水中，馴養四十五分鐘。
- 2.以活體解剖取出 0.5 毫升卵子分別放入空燒杯中，加入與馴養鹽度相同的人工海水 4.5 毫升（即稀釋十倍）。
- 3.以微量吸管吸取 0.005 毫升稀釋液，製作玻片，隨機取三列視野計算“破裂”與“未破裂”之卵子數目，同鹽度的人工海水每次觀察二個玻片。
- 4.找出卵子最完整的馴養鹽度。
- 5.整個步驟共做三次，並把三個數據加以平均。

方法(二)：精子和卵子濃度比對受精率及卵裂率的影響

- 1.將新鮮牡蠣放於鹽度千分之 35 人工海水馴養 45 分鐘。
- 2.用光學顯微鏡觀察生殖腺取出物判斷雌雄，

然後分別以活體解剖取出精子和卵子暫置燒杯中，再以微量吸管分別吸取6ml加入54ml的千分之35人工海水，以作為基準濃度（稀釋十倍）。

3.從基準濃度取4ml精子、20ml卵子（1：5）；4ml 精子、12ml 卵子（1：3）；4ml 精子、4ml 卵子（1：1）；12ml 精子、4ml 卵子（3：1）；20ml 精子、4ml 卵子（1：1）；分別加入裝有26ml、34ml、42ml、34ml、26ml 千分之35人工海水的燒杯中，並以打氣機打氣以增加溶氧。

4.45分鐘後再以微量吸管吸取0.005毫升稀釋液，製作一個玻片，共製作三個，每個玻片隨機選取三列視野，計算視野下受精卵及未受精卵的總數，並求出受精率及破裂率【受精與否以核的消失為準】；2小時後再製作一次玻片，方法同上，計算視野下卵裂卵及未卵裂卵的總數，求出卵裂率。

5.整個步驟共做三次，並把三個數據加以平均。

### 方法(三)：鹽度對牡蠣的受精率及卵裂率的影響

除了將精子和卵子適量加入千分之27.5、千分之30、千分之32.5、千分之35、千分之37.5之人工海水，並調整最終體積為50毫升外，其餘步驟同方法（二）。

### 方法(四)：鈣離子對牡蠣的受精率及卵裂率的影響

除了取20ml精子、4ml卵子（5：1）加入裝有26ml千分之35人工海水的燒杯中，利用1M氯化鈣溶液調整燒杯中的鈣離子濃度為0.1mM、0.5mM、1mM、10mM、30mM。【各濃度另置一杯作對照組，單獨

只取4ml卵子加入裝有46ml千分之35人工海水的燒杯中，不加入精子】外，其餘步驟同方法（二）。

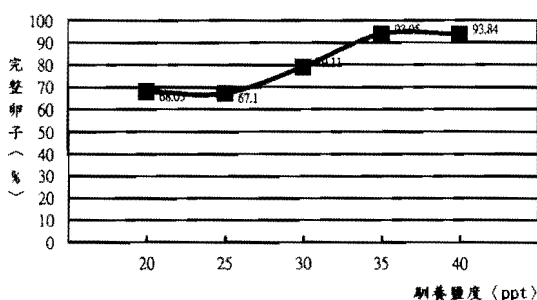
### 方法(五)：溫度對牡蠣的受精率及卵裂率的影響

除了取20ml精子、4ml卵子（5：1）分別加入裝有26ml千分之35人工海水的燒杯中，分別以保麗龍固定於21℃、23℃、25℃、27℃、29℃的大水缸中，以冰塊和熱水控溫外，其餘步驟同方法（二）。

## 四、研究結果：

### 馴養的最佳鹽度

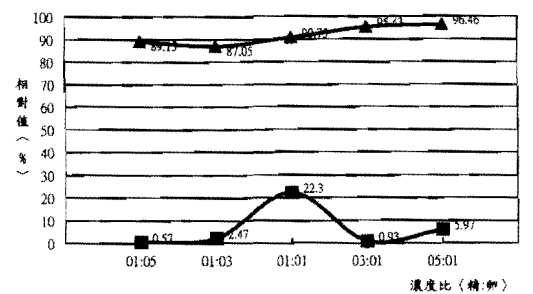
由於沿岸海水鹽度差異甚大，為確保實驗的準確性，需先經過馴養的步驟，使其原始條件相同。在選取的5個馴養鹽度中，千分之35的人工海水平均破裂率（見封底圖(A)(B)）最低，為6.05%，千分之40的人工海水平均破裂率為6.16%，其他三種鹽度的平均破裂率皆大於20%。結果以千分之35的人工海水馴養45分鐘，未破裂率最高，也就是卵細胞的完整性最佳，馴養效果最好（圖一）。



圖一 馴養的最佳鹽度。在35ppt的人工海水馴養下，卵子有較高的完整性。

精子和卵子的濃度比對受精率及卵裂率的影響

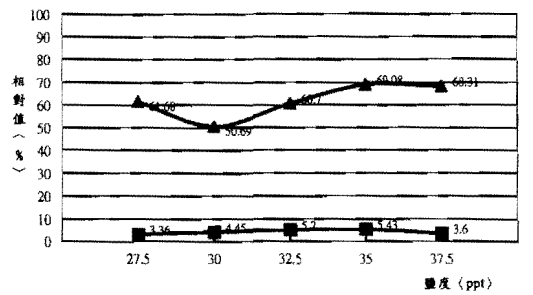
此實驗的目的是想探求在哪一種精卵比例下，可以找出最佳的受精率及卵裂率。在五種比例下，以精卵比 5：1 的受精率（見封底圖(C)、(D)）最高，達到 96.46%，而以 1：3 的受精率最低，至於卵裂率（見封底圖(E)），則以 1:1 者為最高（圖二）。



圖二 不同精卵濃度比對受精率（上）及卵裂率（下）的影響

鹽度對牡蠣的受精率及卵裂率的影響

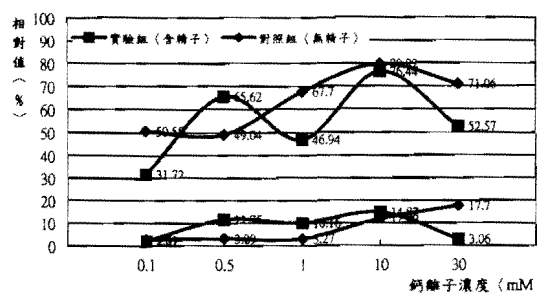
以粗鹽配製了五種鹽度不同的人工海水，依照之前的結果（圖二），以精卵濃度比 5：1 的比例混合，並調整最終體積為 50 毫升。經過 45 分鐘後，觀察並計算其受精率。結果以鹽度 35ppt 受精率及卵裂率最佳（圖三）。



圖三 不同鹽度對受精率（上）及卵裂率（下）的影響

鈣離子對受精率及卵裂率的影響

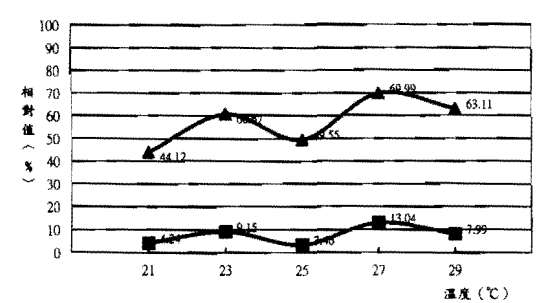
由於鈣離子會影響細胞膜的通透性，我們想知道膜通透性的改變是否影響受精率。然而牡蠣有孤雌生殖（parthenogenesis）的現象，且鈣離子濃度會影響孤雌生殖發生率，為了區別鈣離子是改變受精率或是孤雌生殖率，所以加做一組不加精子為對照組。在五種鈣離子濃度下，實驗組以 10mM 的受精率及卵裂率最高；完全不含精子的對照組則以 10mM 的受精率最高，而 30mM 的卵裂率最高（圖四）。



圖四 不同鈣離子濃度對受精率（上）及卵裂率（下）的影響

溫度對牡蠣的受精率及卵裂率的影響

根據本地夏天所測量到的海水溫度，選取五種溫度進行本實驗。結果為在 27℃ 的水溫下受精率及卵裂率為最高（圖五）。



圖五 不同溫度對受精率（上）及卵裂率（下）的影響

## 五、討論：

牡蠣屬於軟體動物門的雙貝綱，雖然雙貝綱多具有兩枚相似的貝殼，身體可以完全縮入殼內，但是牡蠣的背殼不規則，左邊比右邊大。牡蠣多棲息在潮間帶或是淺海的礁岩海底，成體以左殼固著在堅硬的底質上，不像其它的雙貝類如文蛤等，可以自由移動。成熟的牡蠣會釋出精子及卵子，在水中受精後發育成浮游的擔輪幼蟲，當時機成熟則固著在基質上發育成帶殼的小牡蠣，與其他的軟體動物一樣，牡蠣的外套膜隨著個體的成長，持續分泌形成含有高鈣的外殼，保護柔軟的身體。牡蠣為廣鹽性貝類，對海水鹽度適應極寬，河口沿岸均能成長的極為良好，相對的在河口及沿岸海域養殖則比較容易受到污染。

世界上的牡蠣有十八屬一百多種，多數可供食用，屬於重要的經濟貝類。臺灣四週的海域有五屬十餘種。本實驗所使用的牡蠣是大牡蠣(*Crassostrea gigas*)，又稱巨牡蠣、長牡蠣、真牡蠣，貝殼灰色略為長型，殼長約 10 公分，是台灣最常見的養殖種類(1, 4)。

由於沿岸海水鹽度差異甚大，為確保實驗的準確性，需先經過馴養的步驟，使其原始條件相同。然而，使用不同鹽度的海水來進行馴養，其卵細胞會因滲透壓的劇烈改變而導致大量破裂現象。因此，為了其後的實驗能順利取得較大量的個體數，必須找取破裂率最低的鹽度值來進行馴養工作。本實驗需要在顯微鏡下進行計數的工作，以隨機取樣的方式，將每個玻片選取三列視野計算

之，而不推算總體個數。然而此法是隨機性的，誤差頗大，難以掌控，於是我們將每個燒杯製作三個玻片，全部三個玻片九個視野的總數才求得一個數據，每個實驗均重覆三次，並加以平均得到我們最終想要的數據。藉此我們得以提高數據的準確性及可信度。在本實驗中，我們根據文獻記載的牡蠣生長鹽度範圍，而選取了 20ppt、25ppt、30ppt、35ppt、40ppt 這五種不同的鹽度值來進行馴養。結果是在 35ppt 的鹽度下牡蠣的卵子未破裂情況最為良好，這與一般認知海水平均鹽度為千分之 35 的觀念相符，雖然牡蠣是廣鹽性貝類，但細胞生理應與自然環境相契合。

以體內受精的人類而言，雖然只有一個精子能與卵子結合，但是精子的總數量降到某一限度時，因卵子無法接觸到精子而導致不孕。相同的，雖然牡蠣為體外受精，精、卵相遇全憑機率，但想必數量比例多少也會對受精情形有些影響。雖然能與一個卵子結合的精子僅有一個，但要能使卵子成功受精，單靠一隻精子是很困難的，因為即使精卵相遇了，其表面構造若不能相合，精子就無法接受信息進入卵子。文獻(4,5)指出，一個卵截面約有 3 到 6 隻精子吸附其上時之受精率最佳。然而我們仍無法精確取出特定數量的精、卵使之受精，於是我們便把單位由“個數”比提升到“毫升比”，以體積作為定量的依據。結果我們得到精卵比 5:1 的受精率最佳。在顯微鏡下，我們觀察到受精卵的表面也往往有五隻以上的精子附著在上面。若超過十隻以上的精子附著，是否會反而使受精率降低，則是未來欲探討的重點。

在方法三精子和卵放在不同鹽度的受精實驗中，由於在方法一的馴養鹽度實驗的結果，鹽度千分之 35 的破裂率最低，所以設定千分之 35 之人工海水為等張溶液，了解鹽度對牡蠣的受精率與卵裂率的影響，發現千分之 35 的受精率與卵裂率均為最高，推論鹽度會影響酵素的活性，間接影響受精率與卵裂率。

因為環境中的離子會影響卵的生理，所以我們探討鈣離子濃度對受精率與卵裂率的影響。但因鈣離子也會促使卵單性生殖，於是我們以實驗組（有精子）與對照組（無精子）來比較鈣離子的影響程度。由圖九可知，實驗組中雖然鈣離子濃度 10mM 的受精率極高，但因其對照組的孤雌生殖率也很高，可知實驗組的受精率應該大部分都是單性生殖造成的。相對鈣離子濃度為 0.5mM 的實驗組受精率高，而對照組的孤雌生殖率較低，所以我們判斷鈣離子 0.5mM 的受精率是最好的。

根據資料顯示，溫度高，牡蠣的成長率與存活率高，在 27℃~28℃時最高，30℃以上會慢慢下降，所以我們取 21℃、23℃、25℃、27℃、29℃等五種溫度加以探討，發現：21℃時，精子的活動力低，隨著溫度升

高，精子的活動力較高。雖然 29℃的精子的活動力比起 27℃是有過之而無不及，但受精率與發育卻不如 27℃，也許是溫度升高酵素的活性受影響，間接影響到卵的機制，反而抑制卵的受精及發育。

本研究的結果可提供中學生物課程「卵發生的觀察」，提高實驗的成功率與可信度。

## 六、參考文獻：

- 1.台灣省水產試驗所（TFRI）網站：<http://www.tfrin.gov.tw>
- 2.中央日報網站：<http://www.cdn.com.tw>
- 3.潮訊（TFRIN），1999，131：10
- 4.潮訊（TFRIN），2000，134：10
- 5.陳紫瑛、鄭金華、陳淳禎、柯惠青、蘇茂森、廖一久，1996，巨牡蠣 *Crassostrea gigas* 之受精及早期胚胎發育，水產研究，4（1）：21-31

## 七、誌謝：

感謝港明高中王春生校長大力支援經費，且提供一個優良的教學及研究環境，七股養殖戶鄭建國先生對本實驗提供許多寶貴的建議，在此一併致上最深的謝意。